

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-3-111-120

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ СЛИЗИСТОЙ ГУБЫ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ АУТОЛОГИЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПРИ ДВУСТОРОННЕМ СИНДРОМЕ ЛИМБАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ РОГОВИЦЫ

С.А. Борзенко^{1, 2}, М.Ю. Герасимов¹, Д.С. Островский¹, Б.Э. Малюгин¹

¹ ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Цель. Постановка методики культивирования эксплантов и апробация упрощенной рецептуры культуральных сред для получения устойчивой популяции эпителия слизистой губы человека без фидерных клеток. **Материалы и методы.** Образцы слизистой губы были получены от 6 пациентов в условиях операционной после подписания информированного добровольного согласия. Экспланты для культивирования выделяли с помощью микрохирургической техники, отделяя подслизистую часть перед слоем эпителия. Культивирование проводили в базовых средах DMEM/F12 (1:1) (1,05 мМ кальция) и EpiLife (0,06 мМ кальция) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки, антибиотика-антимикотика, инсулина 5 мкг/мл, гидрокортизона 5 мкг/мл и эпидермального фактора роста 10 нг/мл. Клетки нулевого пассажа окрашивали на маркеры стволовости и пролиферации (p63), промежуточных филаментов (виментин) и белка плотных межклеточных контактов тип 1 (ZO-1). Анализ изображений проводили в программе Fiji (ImageJ). **Результаты.** Первичная культура клеток эпителия слизистой губы была получена от всех доноров в обеих группах. Морфология клеток в культурах соответствовала классическому, по типу «бульжной мостовой». При культивировании в среде с 1,05 мМ кальция определялось 34,7% клеток (медиана, n = 3), экспрессирующих маркер p63, а длина участков экспрессии белка ZO-1 составила 17,05 мкм на клетку по медиане (n = 3). В культуре клеток в среде с 0,06 мМ кальция положительная экспрессия маркера p63 составила 39,2% (медиана, n = 3), а длина участков экспрессии белка ZO-1 была определена как 5,18 мкм на клетку по медиане (n = 3). **Заключение.** В настоящей работе представлен подробный протокол получения культуры клеток эпителия слизистой губы человека с высокой пролиферативной активностью из малого биоптата без фидерного слоя. Рецептура среды с 1,05 мМ кальция активизирует образование плотных межклеточных контактов, и может быть использована при моделировании дифференцировки эпителия *in vitro*. Рецептура среды с 0,06 мМ кальция, напротив, поддерживает сниженный уровень созревающих клеток в культуре. Таким образом, рецептура культуральных сред, источник и способ культивирования клеток, описанные в данном исследовании, могут являться основой для трансплантации аутологичного клеточного конструкта клеток эпителия слизистой губы у пациентов с двусторонним синдромом лимбальной недостаточности.

Ключевые слова: эпителий слизистой губы, первичная культура клеток, факторы роста, роговица, синдром лимбальной недостаточности.

Для корреспонденции: Герасимов Максим Юрьевич. Адрес: 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, 59а. Тел. (499) 488-85-58. E-mail: gerasimovmy@mntk.ru

For correspondence: Gerasimov Maxim Yurievich. Address: 127486, Beskudnikovsky blvd., 59a, Moscow, Russian Federation. Tel. (499) 488-85-58. E-mail: gerasimovmy@mntk.ru

CELL CULTURE TECHNIQUE FOR HUMAN LABIAL MUCOSAL EPITHELIUM FOR USE IN PATIENTS WITH BILATERAL LIMBAL STEM CELL DEFICIENCY

S.A. Borzenok^{1, 2}, M.Yu. Gerasimov¹, D.S. Ostrovskiy¹, B.E. Malyugin¹

¹ S.N. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

² A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Aim: to obtain a stable population of the human labial mucosal epithelium without feeder cells using explant method and simplified formulation of the culture media. **Materials and methods.** Labial mucosa were obtained from 6 patients in the operating room after signed informed consent. Samples were trimmed of the substantia propria and cut into uniformed explants. Cell culture were done using DMEM/F12 (1:1) (1.05 mM Ca) and EpiLife (0.06 mM Ca) media supplemented with 5% fetal bovine serum, antibiotic-antimycotic, insulin (5 µg/mL), hydrocortisone (5 µg/mL), and epidermal growth factor (10 ng/mL). Primary cells were stained against stemness and proliferative marker (anti-p63), intermediate filaments (anti-vimentin), and tight junction protein-1 (anti-ZO-1). Image analysis was performed in Fiji (ImageJ). **Results.** Primary cell culture were obtained from all the samples in both media. Cellular morphology was characterized as a classic «cobblestone» phenotype. It was found that p63 expression in medium with 1.05 mM Ca were detected in 34.7% cells (median, n = 3), and ZO-1 expression was estimated as 17.05 µm per cell (median, n = 3). In cells cultured in 0.06 mM Ca medium positive expression of the p63 were found as 39.2% (median, n = 3), and the length of the ZO-1 expression were calculated as 5.18 µm per cell (median, n = 3). **Conclusion.** This study presents a detailed protocol for obtaining the cell culture of human labial mucosal epithelium with high proliferative activity from a small biopsy without feeder cells condition. 1.05 mM Ca medium promoted generation of the tight junction and may be used in *in vitro* epithelial differentiation models. In opposite, medium with 0.06 mM Ca sustained lowered level of maturation in cell culture. Thus, media formulations, source and method of cell culture described in this study, may be used for the transplantation of the autologous labial mucosal epithelium in patients with bilateral limbal insufficiency.

Key words: labial mucosal epithelium, primary cell culture, cell growth factors, cornea, limbal stem cell deficiency.

ВВЕДЕНИЕ

Роговица человека в норме покрыта неороговевающим многослойным плоским эпителием [1], который обновляется за счет лимбальных эпителиальных стволовых клеток (ЛЭСК) [2], расположенных в зоне лимба в криптах Вогта и фокальных стромальных проекциях [3, 4]. При обширном повреждении ЛЭСК развивается синдром лимбальной недостаточности (СЛН) [5], который в развитой стадии характеризуется наличием непрозрачного фибро-васкулярного паннуса на месте переднего эпителия, который препятствует прохождению света через роговицу, вызывая слепоту и слабовидение [6].

Двусторонний СЛН может развиваться при таких заболеваниях, как аниридия, синдром Стивенса–Джонсона, а также в случае ожогов роговицы обоих глаз [7]. Для реабилитации этой группы пациентов предлагаются хирургические методы трансплантации аллогенного лимба в сочетании с длительной иммуносупрессией [8]. Перспективным направлением лечения двустороннего СЛН является клеточная терапия культивированными клетками эпителия полости рта [9]. На заре становления метода исследо-

ватели проводили трансплантацию аутологичного культивированного буккального эпителия [10, 11], в связи с тем что он морфологически схож с передним эпителием роговицы, а именно является неороговевающим многослойным плоским и контактирует с окружающей средой [12]. Вместе с этим как в преддверии, так и собственно в полости рта имеются зоны эпителия с идентичной морфологией. Это слизистая губы, а также нижняя поверхность языка, мягкого неба и дна полости рта [12]. По данным литературы, основным источником клеток для создания терапевтического конструкта долгое время оставался эпителий щеки (буккальный) [9, 13]. При этом слизистая губы как источник клеток для создания клеточного конструкта эпителия ранее подробно не изучалась.

Согласно литературным данным, пропись культуральных сред для селективного наращивания клеток эпителия полости рта предполагает наличие общего митогена, L-глутамин, деконтаминационных компонентов и факторов, стимулирующих рост собственно эпителия [14]. В большинстве опубликованных работ для получения культуры буккального эпителия использовалась базовая среда DMEM/F12 (1:1 ÷ 1:3),

содержащая $1,05 \div 1,425$ мМ кальция [14]. Однако, согласно Р.Я. Фрешни, низкокальциевая среда (0,06–0,07 мМ) предпочтительнее, так как поддерживает пролиферативную активность культивируемых эпителиальных клеток, не вызывает их дифференцировки и способствует элиминации фибробластоподобных клеток [15]. Также ранние методики культивирования включали в себя фидерные слои клеток и другие ксеногенные компоненты, как, например, экстракт гипофиза быка. При этом в современных работах было показано, что фидерные слои могут быть исключены [16], а среди множества специфических факторов для стимуляции роста эпителия могут быть использованы только три, а именно: инсулин, гидрокортизон, эпидермальный фактор роста (ЭФР) [17], каждый из которых выпускается рядом компаний по правилам GMP (англ., Good Manufacturing Practice, Надлежащая производственная практика).

Цель исследования – постановка методики культивирования эксплантов и апробация упрощенной рецептуры культуральных сред для получения устойчивой популяции эпителия слизистой губы человека без фидерных клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Рецептура культуральной среды

В настоящей работе в качестве базовых были использованы следующие культуральные среды с 2 мМ L-глутамин: DMEM/F12 (1:1) (D6421, Sigma Aldrich), содержащая 1,05 мМ кальция и феноловый красный, и EpiLife (MEPICFPRF500, Gibco) с 0,06 мМ кальция без фенолового красного. Среда EpiLife схожа по рецептуре со средой для кератиноцитов MCDB 153 [18] и в отличие от таких базовых сред, как DMEM/F12, содержит хлорид никеля, парамолибдат и метаванадат аммония, селенит натрия, метасиликат натрия, хлорид олова и липоевую кислоту [19]. В качестве общего митогена использовали эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС) (SH30109.03, NuClone Laboratories) в концентрации 5%. Для профилактики роста патогенной микрофлоры в культуральную среду добавляли 100 У/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В (A5955, Sigma Aldrich). Среди специфических факторов для стимуляции роста эпителия полости рта были использованы инсулин растворимый человеческий генно-инженерный короткого действия 5 мкг/мл (Хумулин Регуляр, раствор для инъекций, «Эли Лилли энд Компани»), гидрокортизон 5 мкг/мл (суспензия для инъекций, 25 мг/мл, Фармак), человеческий рекомбинантный эпидермальный фактор роста (ЭФР) 10 нг/мл (ФР-08000, ПанЭко). Готовые полные культуральные среды хранились при +4 °С без доступа света.

Выделение ткани слизистой губы

Все исследования выполнялись в структурных подразделениях ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова».

Для получения первичной культуры клеток эпителия использовали остатки ткани свободного лоскута слизистой губы, выделенные во время его пересадки при выполнении плановых операций в Отделе реконструктивной и пластической хирургии. Исследование было одобрено ЛЭК (протокол № 88.5 от 11 октября 2018 г.). Забор ткани выполнялся после подписания пациентом добровольно-информированного согласия на использование остатков его тканей в научно-исследовательских целях. Свободный лоскут выделялся стандартно с соблюдением правил асептики и антисептики. Для этого слизистую губы обрабатывали стерильным марлевым тампоном, смоченным в растворе Йодофтала (ООО «НЭП МГ») в течение одной минуты. Затем проводили инфильтрационную анестезию зоны интереса 2% раствором лидокаина (ООО «ГРОТЕКС»). Держалкой фиксировали губу, получая доступ к слизистой. Далее лезвием проводили разрез слизистой латерально от уздечки, так чтобы получить полнослойный лоскут в форме лепестка. В ходе операции выкраивался лоскут, необходимый для пересадки, а остатки ткани помещались в среду Борзенка–Мороз (ООО «НЭП МГ»). На края сформированного дефекта слизистой накладывали от 5 до 7 отдельных узловых швов. В послеоперационный период пациенты соблюдали туалет полости рта в соответствии со стандартным послеоперационным протоколом.

Первичная культура эпителия слизистой губы

Все работы с клеточным и тканевым материалом проводились в Лаборатории трансплантологии и клеточной биологии Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем в соответствии с установленным санитарно-эпидемиологическим режимом. Для соблюдения асептических условий работу с материалом проводили в рабочем пространстве ламинарных боксов II класса безопасности. Все приборы и инструменты на момент проведения работ были откалиброваны согласно нормативам и подготовлены в соответствии с требованиями правил асептики. Под стандартными условиями культивирования понимали постоянно поддерживаемые в инкубаторе (NU5510, NuAir) температурный режим 37 °С, 5% концентрацию CO₂ и 100% влажность.

Всего от 6 пациентов было получено 6 образцов слизистой верхней или нижней губы в форме узкой полоски шириной около 1,5–2,0 мм и длиной менее 1 см. Ткань транспортировали и хранили в среде Борзенка–Мороз при +4 °С. Получение кусочков для по-

следующего посева проводили следующим образом. Ткань переносили на чашку Петри эпителиальной стороной вниз и с помощью микрохирургического пинцета и ножниц отделяли подслизистую часть до появления белесоватой прослойки перед слоем эпителия. Полученную полоску разрезали на кусочки с поперечными размерами 1,0–1,5 мм. При проведении описанных манипуляций для профилактики их высыхания на ткань и кусочки наносили среду Борзенка–Мороз. Этапы обработки полоски слизистой губы для посева и первичного культивирования эпителия представлены на рис. 1.

Первичную культуру клеток эпителия слизистой губы получали методом культивирования эксплантов. Для этого кусочки, полученные после отделения подлежащей ткани, укладывали эпителием вверх (белесоватой прослойкой вниз) на культуральную поверхность чашек Петри (430165, Corning) или 4-луночных слайд-флаконов (30104, SPL). Далее образцы оставляли с открытой крышкой для их пер-

вичного «присыхания» в течение 1–2 минут в условиях ламинарного бокса. Затем на кусочки наносили по 40 мкл полной культуральной среды, закрывали крышку культуральной посуды и перемещали в стандартные условия инкубатора на 3–4 часа. После этого на кусочки очень медленно добавляли по 500 мкл полной культуральной среды и культивировали в стандартных условиях. Визуальный контроль роста клеток осуществляли на инвертированном световом фазово-контрастном микроскопе IX-81 (Olympus). Описывали рост и морфологию культуры клеток. Культуральную среду меняли полностью с момента визуализации первых пролиферирующих клеток и далее через каждые сутки. Клетки в чашках Петри и в слайд-флаконах культивировали до достижения 90% конfluenceности.

Флуоресцентная иммуноцитохимия

Окраску клеток проводили по следующему протоколу. Клетки в культуральных слайд-флаконах

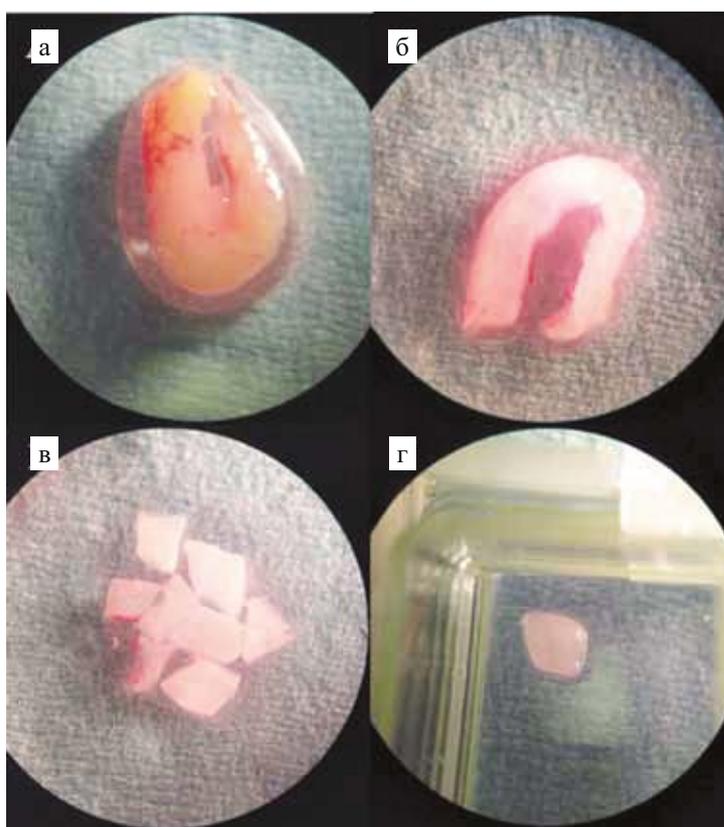


Рис. 1. Этапы обработки и посева эксплантов слизистой губы человека, макросъемка: а – вид полоски слизистой в капле среды Борзенка–Мороз, полоска ткани обращена эпителиальной стороной вниз, видна жировая прослойка подслизистой; б – полоска слизистой после удаления подслизистой, видны белесые прослойки, под которыми располагается эпителий; в – экспланты слизистой, подготовленные для посева; г – эксплант на поверхности слайд-флакона, обращенный эпителиальной стороной вверх

Fig. 1. Stages of processing and seeding of human labial mucosal explants, macro photography: а – overview of the strip of a labial mucosa in a drop of the Borzenk–Moroz medium, a strip of tissue facing the epithelial side down, and visible fatty submucosal layer anteriorly; б – a strip of the labial mucosa after removal of the submucosa, visible whitish layer, with underlying the epithelium; в – labial mucosa explants prepared for seeding; г – explant on the surface of the well of a glass culture slide with the epithelial side facing up

отмывали фосфатным буферным раствором (PBS) (В-60201, ПанЭко) три раза по 5 минут. Затем фиксировали в 10% нейтральном формалине (141328, AppliChem) в течение 10 минут. Пермеабиллизацию проводили 0,3% раствором тритона X-100 (X100, Sigma Aldrich) в PBS в течение 15 минут. Для блокировки сайтов неспецифического связывания использовали блокирующий раствор, содержащий 5% фетальной бычьей сыворотки (SH30109.03, HyClone Laboratories) и 0,1% сапонина (84510, Sigma Aldrich), в PBS в течение 1 часа. После этого в лунки добавляли разведенные в блокирующем растворе первичные антитела к таким маркерам, как рб3 (стволовость, пролиферация) [20] (1:300, ab124762, Abcam), виментин (промежуточные филаменты) [21] (1:250, ab8978, Abcam), ZO-1 (*англ.*, Zonula occludens-1, белок плотных межклеточных контактов тип 1) [22] (1:100, ab216880, Abcam). В контрольные лунки первичные антитела не добавляли, а использовали тот же объем блокирующего раствора. Слайды инкубировали 18 часов при +4 °С. После отмывания в блокирующем растворе во все лунки добавляли вторичные флуоресцентные антитела Alexa Fluor 488 (1:250, ab150077, Goat Anti-Rabbit IgG, Abcam) или Alexa Fluor 594 (1:250, ab150116, Goat Anti-Mouse IgG, Abcam), разведенные в блокирующем растворе. Далее клетки инкубировали в течение 1 часа при +4 °С в темноте. Затем вторичные антитела удаляли и производили окраску ядер красителем Hoechst (O150, ПанЭко) в течение двух минут во всех лунках. Слайд-флаконы разбирали и монтировали под покровное стекло со средой для заключения гистологических препаратов VitroGel (12-001, BioVitrum). Детекцию иммунофлуоресценции проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Fluoview FV10i (Olympus).

Анализ изображений

Первичная подготовка изображений осуществлялась во внутренней программной среде микроскопа Fluoview FV10i. Полученные фотографии затем анализировались в программе Fiji (ImageJ 2.0.0-rc69/1.52) [23]. Подсчет ядер по красителю Hoechst, а также ядер, положительных на маркер рб3, проводили с помощью плагина CellCounter. Для определения длины участков экспрессирующегося белка ZO-1 использовали внутренние базовые инструменты Set Scale, Segmented line и Measure. Для этого вначале устанавливали значение соотношения мкм к пикселям изображения (Set Scale), затем вручную рисовали линию (Segmented line), совпадающую с экспрессией ZO-1, и наконец, вычисляли длину участка (Measure). Общую сумму длин делили на количество ядер на фотографии.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поведение первичной культуры *in vitro*

При наблюдении за первичным прикреплением ткани и началом роста культуры клеток эпителия были эмпирически определены ряд манипуляций, способствующих адгезии кусочков и росту культуры клеток. А именно: подсушивание образцов на культуральном пластике перед добавлением полной культуральной среды обеспечивает лучшее их прикрепление, образцы не всплывают, в культуре образуется меньше дебриса и отпавших дифференцированных клеток. В первое время, до появления роста клеток, необходимо крайне аккуратно закрывать дверцы инкубатора для предотвращения сотрясения кусочков. Отрыв в первые несколько суток замедляет их повторную адгезию. Это приводит к тому, что кусочки, плавающие в среде, начинают отбрасывать дебрис и клетки, засоряя культуру. Кусочки, подготовленные для посева, необходимо укладывать на культуральную поверхность эпителиальной стороной вверх. В обратном случае они не прикреплялись и рост отсутствовал. Эпителиальную сторону экспланта отличает отсутствие белесоватых полосок, относительная прозрачность и наличие гладкой поверхности, имеющей блики. При появлении первых признаков роста необходимо аккуратно промывать культуру от открепившихся клеток и далее использовать номинальный объем полной культуральной среды: по 1 мл для лунки 4-луночного слайд-флакона, и по 2 мл для чашки Петри 35 мм.

При соблюдении методических условий, описанных выше, первичная культура клеток эпителия слизистой губы была получена от всех доноров в обеих группах. Морфология клеток в культурах соответствовала классическому по типу «бульжной мостовой», однако была отмечена вариативность в размере площади клеток (рис. 2, а, б), более выраженная для образцов, культивированных в среде DMEM/F12. В целом в течение всего срока первичного культивирования сохранялись характерная морфология эпителиальных клеток и относительная равномерность их размеров.

При культивировании на полной культуральной среде на базе DMEM/F12 с 1,05 мМ Ca⁺⁺ выход клеток из кусочка отмечали на 3–5-й день. По мере роста в культуре образовывались зоны, где клетки становились большими по площади. Эти зоны затем увеличивались в размере, а крупные клетки начинали открепляться, образуя пустоты, которые затем новыми клетками уже не заполнялись. В процессе культивирования на указанной среде образовывалось много круглых неприкрепившихся клеток. Отмечали, что в ряде случаев из кусочка распространялись фибробласты, имеющие характерную морфологию. В ходе наблюдения за первичной культурой на базе DMEM/

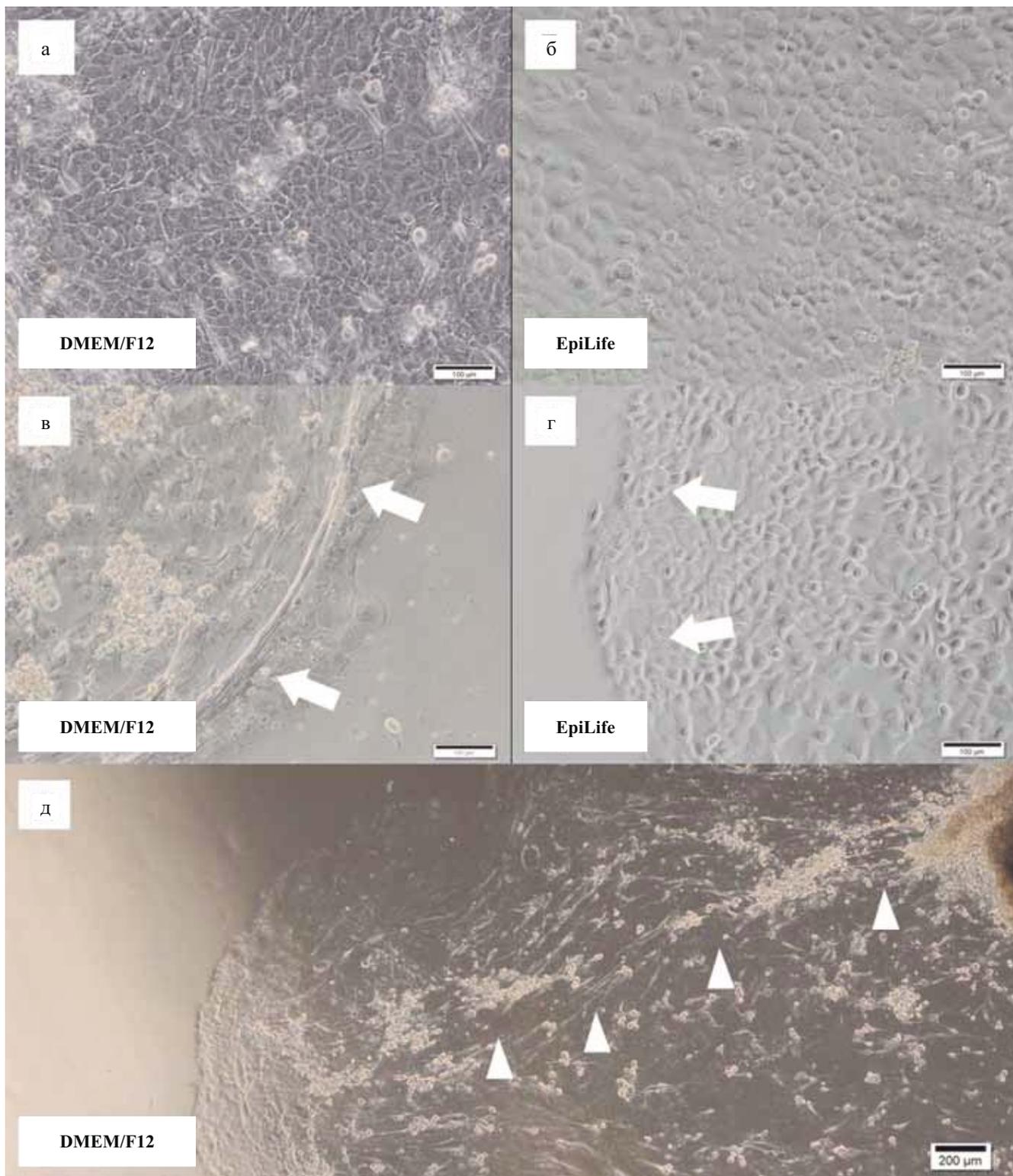


Рис. 2. Морфологическая картина первичной культуры клеток эпителия губы человека, полученная в средах DMEM/F12 (1,05 mM Ca) или EpiLife (0,06 mM Ca): а, б – первичная культура клеток классического фенотипа «булыжная мостовая», видны участки с крупными и мелкими клетками; в – микрофотография феномена «волны роста» (отмечено стрелками); г – отсутствие «волны роста» в культуре клеток эпителия на среде EpiLife (отмечено стрелками); д – микрофотография тяжа конгломератов клеток от экспланта (отмечено стрелками); а–г – световая фазово-контрастная микроскопия; д – комбинированное фото; а–г – $\times 100$, д – $\times 40$

Fig. 2. Morphology of the primary culture of human labial mucosal epithelial cells obtained in DMEM/F12 (1.05 mM Ca) or EpiLife (0.06 mM Ca) media: а, б – primary cell culture had the classical «cobblestone» phenotype. Areas with large and small cells are visible; в – micrograph of the phenomenon of «growth wave» (marked by arrows); г – the absence of a «growth wave» in the epithelial cell culture on the EpiLife medium (marked by arrows); д – micrograph of the trace of conglomerates of cells from the explant (indicated by arrows); а–г – phase-contrast microscopy; д – combined photo; а–г – $\times 100$, д – $\times 40$

F12 был зафиксирован феномен «волны роста», который может быть описан как волна конгломерата делящихся клеток, распространяющаяся от кусочка ткани. При этом от кусочка ткани к «волне роста» формировались радиальные тяжи клеток (рис. 2, в, д).

При культивировании на полной культуральной среде на базе EpiLife с 0,06 мМ Ca⁺⁺ отмечали более поздний (на 5–8-й день) выход клеток эпителия из кусочка. В целом рост клеток был медленнее в сравнении с первой группой. Феномена «волны роста» и наличия тяжелей конгломератов клеток от кусочка не отмечали (рис. 2, г). Однако культуру, полученную на низкокальциевой базовой среде, отличала лучшая морфология клеток. В основном присутствовали мелкие полигональные клетки с крупным ядром. Встречались небольшие участки с более крупными клетками и относительно меньшим ядром, что характерно для созревающих клеток. Количество открепившихся клеток было минимальным. Рост фибробластов был отмечен только в одном случае.

Иммунофенотипическая характеристика клеток

По данным флуоресцентной иммуноцитохимии в клетках детектировали положительную экспрессию по маркеру р63, которая была солокализована с ядерным красителем Hoechst. А именно в клетках, культивированных в среде DMEM/F12 (1:1), определялось 34,7% таких клеток по медиане (n = 3), в то время как при использовании среды EpiLife – 39,2% (медиана, n = 3). В клетках обеих групп отмечалась слабopоложительная экспрессия виментина с некоторым преобладанием в образцах группы EpiLife. Экспрессия белка ZO-1 была представлена по краю крупных клеток. По данным программного анализа длина участков экспрессии белка ZO-1 в пересчете на количество ядер составила по медиане (n = 3) 17,05 мкм на клетку для группы DMEM/F12 (1:1) и 5,18 мкм для EpiLife.

ОБСУЖДЕНИЕ

Получение устойчивой культуры эпителиальных клеток является в целом сложной методической задачей. Поддержка пролиферации эпителиальных клеток и ингибирование избыточного роста фибробластов позволяет добиваться определенной чистоты культуры вне зависимости от метода выделения клеток [15]. В частности, для культивирования эпителия щеки человека могут быть использованы такие специализированные факторы роста, как инсулин, трансферрин, гидрокортизон, холерный токсин, эпидермальный фактор роста, трийодтиронин, экстракт гипофиза быка (Bovine Pituitary Extract, *англ.*) [14]. Однако для получения клеточного конструктора для применения в клинике в

рецептуре среды должны отсутствовать ксенобiotические компоненты, а факторы роста должны быть произведены по правилам надлежащей клинической практики [24]. Примечательно, что, согласно M. Fogtmanek et al. [17], холерный токсин и трийодтиронин не оказывают значимого положительного действия на пролиферацию эпителия полости рта, в отличие от комбинации гидрокортизона, эпидермального фактора роста и инсулина. Поэтому в настоящей работе изучались указанные три фактора, а использованные в рецептуре инсулин и гидрокортизон были выпущены фармацевтическими предприятиями для применения у пациентов.

В настоящей работе была использована среда с низким содержанием кальция (0,06 мМ), относящаяся к селективным средам, для сравнения результатов культивирования со стандартной культуральной средой, содержащей 1,05 мМ кальция (DMEM/F12). Это позволило зафиксировать тенденции повышения пролиферации и снижения уровня дифференциации культивируемых эпителиальных клеток в низкокальциевой среде. В настоящей работе также не применялись фидерные слои, что позволит гарантированно исключить перенос фидерных клеток при трансплантации аутологичного клеточного конструктора пациентам.

Методика культивирования эксплантов, использованная в работе, имеет ряд преимуществ перед методом ферментативного выделения, а именно позволяет сохранять внеклеточный матрикс и использовать образцы ткани малого размера. По нашему мнению, культивирование эксплантов в комбинации с низкокальциевой селективной средой ограничивает выход резидентных фибробластных клеток из экспланта, а наличие лучшей комбинации специализированных факторов роста позволяет эпителию активно пролиферировать, занимая культуральную поверхность.

По результатам иммунофлуоресцентной окраски при культивировании эпителия слизистой губы была отмечена высокая активность по маркеру р63 в обеих рецептурах сред. При этом полученные значения были близки к таковым, опубликованным в работе по культивированию клеточных слоев эпителия щеки для пересадки, где было показано, что клеточный конструктор содержал $30,7 \pm 7,6\%$ (среднее \pm станд. откл.) р63 позитивных клеток [25]. Экспрессия виментина, белка промежуточных филаментов, наиболее часто ассоциируется с мезенхимальным фенотипом культивируемых клеток или с феноменом эпителиально-мезенхимальной пластичности [26]. Слабая экспрессия виментина, отмеченная в культурах, подтверждает, что протокол культивирования и рецептура сред, использованные в работе, позволяют сохранять эпителиальный фенотип клеток. Экспрессия белка плотных межклеточных контактов (ZO-1) представляет собой важный маркер дифференциации

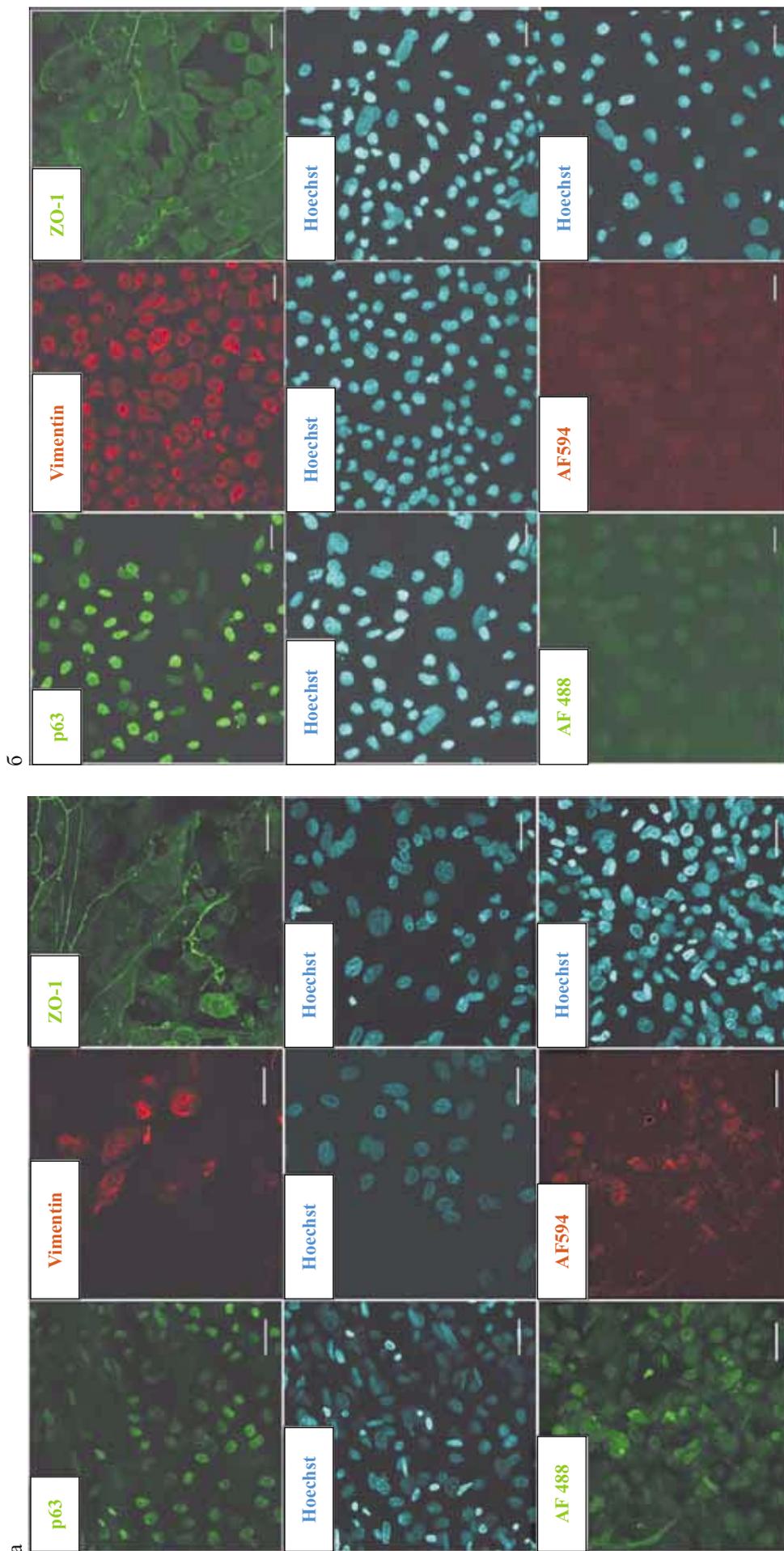


Рис. 3. Экспрессия иммуноцитохимических маркеров в первичной культуре клеток эпителия губы человека, культивированных в средах DMEM/F12 (1,05 mM Ca) и EpiLife (0,06 mM Ca) (б). Маркер p63 (AlexaFluor 488), солокализованный с ядерным красителем Hoechst. Виментин (AlexaFluor 594), представленный в цитоплазме окрашенных клеток. Маркер ZO-1 (AlexaFluor 488), экспрессирующийся по краю крупных клеток. Контрольные образцы флуоресцентных красителей Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 и Hoechst (нижний ряд, слева – направо). Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, $\times 600$

Fig. 3. Expression of immunocytochemical markers in the primary culture of human labial mucosal epithelial cells cultured in DMEM/F12 (1.05 mM Ca) and EpiLife (0.06 mM Ca) media (б). The p63 marker (AlexaFluor 488), co-localized with the Hoechst nuclear dye. Vimentin (AlexaFluor 594), represented in the cytoplasm of the stained cells. ZO-1 marker (AlexaFluor 488), expressed on the edge of large cells. Control samples of fluorescent dyes Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 and Hoechst (bottom row, left to right). Confocal laser scanning microscopy, $\times 600$

эпителиальных клеток, связанный с физиологическим процессом прикрепления клеток друг к другу для формирования плоского эпителиального слоя [27]. В настоящем исследовании было отмечено снижение экспрессии маркера ZO-1 в среде с 0,06 мМ кальция, что согласуется с рекомендациями по поддержанию недифференцированного состояния эпителиальных клеток в культуре [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе представлен протокол культивирования эпителия слизистой губы человека без фидерного слоя, что значительно упрощает методологию подготовки аутологичного клеточного конструкта и позволяет избежать его контаминации клетками фидера. Протокол позволяет получать клетки с высоким пролиферативным потенциалом, используя относительно малый биоптат. В работе также апробирована упрощенная рецептура культуральной среды в двух вариантах. Использование среды DMEM/F12 в качестве базовой позволяет активировать созревание клеток, что может быть применено при моделировании дифференцировки эпителия *in vitro*. Рецептура среды с 0,06 мМ кальция поддерживает сниженный уровень созревающих клеток в культуре, и следовательно, представляется перспективной для получения клеточного конструкта и его пересадки пациентам при несостоятельности эпителиальных стволовых клеток роговицы. Следует отметить, что указанные рецептуры сред могут быть усовершенствованы. Так, для полного исключения ксеногенных компонентов эмбриональная телячья сыворотка может быть заменена на аутологичную, а такие компоненты, как инсулин, гидрокортизон и ЭФР, в настоящее время производятся с соблюдением правил GMP.

Таким образом, рецептура культуральных сред, источник и способ культивирования клеток, описанные в данном исследовании, могут являться основой для трансплантации аутологичного клеточного конструкта клеток эпителия слизистой губы у пациентов с двусторонним синдромом лимбальной недостаточности.

Работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации по программе НИОКТР (АААА-А18-118082290065-4).

The study was supported by the Ministry of Healthcare of the Russian Federation by program NIOKTR (АААА-А18-118082290065-4).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Афанасьева Ю.И., Юрина Н.А.* Гистология. М.: Медицина, 2002. 146. *Afanasyeva YuI, Yurina NA.* Gistologia. M.: Medicina, 2002. 146.
2. *Dua HS, Azuara-Blanco A.* Limbal Stem Cells of the Corneal Epithelium. *Surv Ophthalmol.* 2000; 44: 415–425. PMID: 10734241.
3. *Davanger M, Evensen A.* Role of the pericorneal psapillary Structure in renewal of corneal epithelium. *Nature.* 1971; 229 (5286): 560–561. <https://doi.org/10.1038/229560a0>.
4. *Shortt AJ, Secker GA, Munro PM, Khaw PT, Tuft SJ, Daniels JT.* Characterization of the limbal epithelial stem cell niche: novel imaging techniques permit *in vivo* observation and targeted biopsy of limbal epithelial stem cells. *Stem Cells.* 2007; 25: 1402–1409. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0580>.
5. *Dua HS, Saini JS, Azuara-Blanco A, Gupta P.* Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J Ophthalmol.* 2000; 48 (2): 83–92. PMID: 11116520.
6. *Sacchetti M, Lambiase A, Cortes M, Sgrulletta R, Bonini S, Merlo D et al.* Clinical and cytological findings in limbal stem cell deficiency. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2005; 243 (9): 870–876. <https://doi.org/10.1007/s00417-005-1159-0>.
7. *Deng SX, Borderie V, Chan CC, Dana R, Figueiredo FC, Gomes JAP et al.* Global Consensus on Definition, Classification, Diagnosis, and Staging of Limbal Stem Cell Deficiency. *Cornea.* 2019; 38 (3): 364–375. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001820>.
8. *Holland EJ, Mogilishetty G, Skeens HM, Hair DB, Neff KD, Biber JM et al.* Systemic immunosuppression in ocular surface stem cell transplantation: results of a 10-year experience. *Cornea.* 2012; 31 (6): 655–661. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31823f8b0c>.
9. *Utheim TP.* Concise review: transplantation of cultured oral mucosal epithelial cells for treating limbal stem cell deficiency-current status and future perspectives. *Stem Cells.* 2015; 33: 1685–1695. <https://doi.org/10.1002/stem.1999>.
10. *Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E et al.* Corneal reconstruction with tissue engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *New Engl J Med.* 2004; 351: 1187–1196. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040455>.
11. *Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Amemiya T, Kanamura N, Kinoshita S.* Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol.* 2004; 88: 1280–1284. <https://doi.org/10.1136/bjo.2003.038497>.
12. *Быков В.Л.* Гистология и эмбриональное развитие органов полости рта человека. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014: 391–393. *B'ykov VL.* Gistologiya i ehmbriional'noe razvitie organov polosti rta cheloveka. M.: GEOTAR-Media, 2014: 391–393. [In Rus].
13. *Chentsova EV, Konyushko OI, Makarov MS, Egorova NS, Zinov'ev MY, Borovkova NV.* Optimization of the Method of Buccal Epithelial Cell Isolation and Culturing

- on Collagen Substrate for Ophthalmologic Application. *Bull Exp Biol Med.* 2015; 159: 168–172. <https://doi.org/10.1007/s10517-015-2915-8>.
14. *Utheim TP, Utheim OA, Khan QE, Sehic A.* Culture of Oral Mucosal Epithelial Cells for the Purpose of Treating Limbal Stem Cell Deficiency. *J Funct Biomater.* 2016; 7: 123. <https://doi.org/10.3390/jfb7010005>.
 15. *Фрешни РЯ.* Культура животных клеток. Практическое руководство. М.: Бином, 2011. 427. *Freshney RI.* Animal cell culture: a practical approach. М.: Binom, 2011. 427. [In Rus].
 16. *Kolli S, Ahmad S, Mudhar HS, Meeny A, Lako M, Figueiredo FC.* Successful application of *ex vivo* expanded human autologous oral mucosal epithelium for the treatment of total bilateral limbal stem cell deficiency. *Stem Cells.* 2014; 32 (8): 2135–2146. <https://doi.org/10.1002/stem.1694>.
 17. *Formanek M, Millesi W, Willheim M, Scheiner O, Kornfehl J.* Optimized growth medium for primary culture of human oral keratinocytes. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1996; 25 (2): 157–160. PMID: 8727592.
 18. *Boyce ST, Ham RG.* Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol.* 1983; 81 (1 Suppl): 33s–40s. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12540422>.
 19. Technical Resources – Media Formulations. EpiLife® Medium without calcium. Available from: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/technical-resources/media-formulation.276.html>.
 20. *Wang JS, Xie HT, Zhang M.C.* Characterization of *ex vivo* Expanded Oral Mucosal Epithelium Cells on Acellular Porcine Corneal Stroma for Ocular Surface Reconstruction. *J Ophthalmol.* 2017; 67: 614–617. <https://doi.org/10.1155/2017/676171>.
 21. *Santibanez N.* Immuno expression of E-cadherin and Vimentin in Normal Oral Mucosa, Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int J Morphol.* 2017; 35: 596–602. PMID: 26045832.
 22. *Nakamura T, Endo K, Kinoshita S.* Identification of human oral keratinocytes stem/progenitor cells by neurotrophin receptor p75 and the role of neurotrophin/p75 signaling. *Stem cells.* 2007; 25: 628–638. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0494>.
 23. *Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012 28; 9 (7): 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
 24. *Food and Drug Administration, HHS.* Current good tissue practice for human cell, tissue, and cellular and tissue-based product establishments; inspection and enforcement. Final rule. *Fed Regist.* 2004; 69: 68611–68688. PMID: 15562555.
 25. *Oie Y, Hayashi R, Takagi R, Yamato M, Takayanagi H, Tano Y et al.* A novel method of culturing human oral mucosal epithelial cell sheet using post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells and modified keratinocyte culture medium for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol.* 2010; 94 (9): 1244–1250. <https://doi.org/10.1136/bjo.2009.175042>.
 26. *Pieper FR, Van de Klundert FA, Raats JM, Henderik JB, Schaart G, Ramaekers FC et al.* Regulation of vimentin expression in cultured epithelial cells. *Eur J Biochem.* 1992; 210 (2): 509–519. PMID: 1459133.
 27. *Squier C, Brogden KA.* Human Oral Mucosa: Development, Structure, and Function. John Wiley & Sons, Inc.; 2011, 23.

Статья поступила в редакцию 23.05.2019 г.
The article was submitted to the journal on 23.05.2019